第28卷 第2期
1985年5月

昆虫学报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 28, No. 2
May, 1985

马拉硫磷和敌百虫混用和轮用的研究：淡色库蚊的酯酶同功酶与抗性的关系*

唐振华　黎云根
(中国科学院上海昆虫研究所)

摘要　用马拉硫磷和敌百虫单独处理30代和31代的淡色库蚊，见到对马拉硫磷和敌百虫的抗性分别为敏感品系的286和303倍，而以马拉硫磷和敌百虫轮用(32代)和混用(31代)处理的品系对马拉硫磷和敌百虫的抗性均在70倍以下。

离体酶的活性测定和酯酶同功酶的酶谱分析均表明，抗性品系体内羧酸酯酶活力高于敏感品系；酸性磷酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的活力两者差异不显著，可见马拉硫磷和敌百虫的抗性主要和羧酸酯酶活力的增长有关。

关键词　淡色尖音库蚊　马拉硫磷　敌百虫　抗药性　酯酶　同功酶

目前杀虫剂的混用和轮用已作为避免和延缓抗性的对策(Georghiou, 1980; Iwata, 1981; 唐振华、黎云根等，1982)。但也有学者认为害虫对混用杀虫剂产生的抗性速度比单独使用时来得快(Sawicki, 1975)。抗性发展往往与使用的药剂的剂量、频率、机理和遗传方式等因子有关。在杀虫剂混用时一般有独立、联合、增效和颉颃作用(唐振华，1980)。而现在一般提倡将两种作用机理不同的，或具有增效作用的，或负交互抗性的杀虫剂混用(Iwata, 1981)。在杀虫剂轮用时，因为抗性个体的生物适合度(biotic fitness)比敏感的低，在停止使用药剂A而用药剂B期间，A药剂抗性基因频率下降，相反时B药剂的抗性基因频率下降，这样就可以延缓抗性的发展(Georghiou, 1980)。

作者等曾在室内以马拉硫磷和敌百虫混用和交替使用处理淡色库蚊(*Culex Pipiens Pallens* Coq.)见到可延缓其抗性发展(唐振华等，1982—3)，并从形式遗传和生化遗传都证实了淡色库蚊对马拉硫磷的抗性为单因子遗传(黎云根等，1982—3; 1984)，对敌百虫的抗性为多因子遗传(张朝远等，1982—3)。与此同时，作者等又研究了马拉硫磷和敌百虫混用和轮用延缓抗性发展的机理，发现淡色库蚊对马拉硫磷和敌百虫的抗性均与体内羧酸酯酶活性增长有关(唐振华、黎云根等，1982—3)，用聚丙烯酰胺电泳技术探索了马拉硫磷和敌百虫混用和交替使用后，淡色库蚊的酯酶同功酶以及酯酶活性与抗性的关系。现将这些结果报告如下。

材料与方法

一、供试药剂

本文于1983年10月收到。
* 本文承刘维德教授指导，庄佩君同志参加部分工作，图表由林爱莲同志复墨，电泳扫描由邓启荣同志协助进行，特此致谢。

敌百虫 (Dipterex) 纯品、马拉硫磷 (Malathion) 纯品、对氧磷 (Paraoxon) 纯品，均为上海昆虫所提供；磷酸三苯酯 (TPP) 实验试剂、毒扁豆碱 (Eserine) 化学纯，上海试剂总厂提供；TBPT(O) 纯品，美国 ICN 公司生产。

二、供试昆虫品系

供试的昆虫品系有以下几个，筛选方法及其抗性发展情况详见唐振华、黎云根等 (1982—3) 一文。

1. 敏感品系(简称 S) 对原有的长期饲养在室内的 SEN 品系进一步选育所得，详见黎云根、唐振华等 (1982—3) 的报告。

2. P 品系 1978 年采自江苏无锡，下面的抗性品系均以它进行筛选而得。

3. RM 品系 单用马拉硫磷进行逐代筛选。

4. RD 品系 单用敌百虫进行逐代筛选。

5. MD 品系 用马拉硫磷和敌百虫混用(1:1)逐代筛选。

6. M-D 品系 用马拉硫磷和敌百虫每隔 2 代交替一次逐代处理。

上述的 RM、RD、MD 和 M-D 品系分别筛选了 30 (或 31) 代。

三、生物测定方法 见唐振华、黎云根等(1982—3)一文。

四、离体酯酶活性测定

1. 酶源制备 取羽化 3—5 天的雌性成蚊用乙醚麻醉后蒸馏水洗 3 次，然后加入一定量的 0.04*M* 磷酸缓冲液 (pH7.0)，在冰浴中匀浆，离心(3,000 转/分) 10 分钟取上清液作酶源。

2. 蛋白质测定 用 Lowry、Rosebrongh 等 (1951) 的方法。

3. 羧酸酯酶的测定 参照 Van Asperen (1962) 的方法。

4. 酸性磷酸酯酶的测定 参照 Bessey、Lowry 等 (1946) 的方法。

5. 乙酰胆碱酯酶的测定 参照 Ellman、Courthey 等 (1961) 的快速测定方法。

五、聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

酶源制备除了以 0.05*M* pH7.2 Tris-HCl 缓冲液为匀浆缓冲液外，基本上同黎云根等(1983)方法。酸性磷酸酯酶加入量为 4 头/每管，羧酸酯酶为 2 头/每管。酯酶带的鉴别借助于以下几种特殊抑制剂：酸性磷酸酯酶抑制剂为 TBPT(O)，羧酸酯酶抑制剂为 TPP (磷酸三苯酯)乙酰胆碱酯酶抑制剂为毒扁豆碱和对氧磷。

六、电泳扫描：详见黎云根、唐振华等 (1982—3) 一文。

结 果

一、生物测定

用马拉硫磷和敌百虫混用(1:1)和交替使用及单独处理 30 代后淡色库蚊抗性发展情况列于表 1。

从表 1 可见单用马拉硫磷和敌百虫处理 30 代后，其抗性比它们的亲代分别提高了 123 和 142 倍；与 S 品系相比，则分别为 286 和 303 倍；而马拉硫磷和敌百虫交替处理的 M-D 品系对马拉硫磷的抗性与亲代和 S 品系相比分别为 27 和 63 倍；对敌百虫的抗性分别为 24 和 53 倍。从这些结果可以看出单用马拉硫磷和敌百虫处理的 RM 和 RD 品系

表 1 用马拉硫磷和敌百虫混用 (1:1)、交替使用和单独使用处理 30 代后的抗性水平

品系	药剂	LC_{50} (ppm)	回归方程式 (y＝)	抗性倍数	
				R/P	R/S
S	马拉硫磷	0.07286	−2.93 + 9.11x		1
	敌百虫	0.07545	−2.775 + 8.859x		1
P	马拉硫磷	0.1696	3.8717 + 4.92x	1	2.32
	敌百虫	0.1612	0.3577 + 3.84x	1	2.14
RM(30)	马拉硫磷	20.87 (17.02)*	−9.61 + 11.07x −4.9995 + 8.1233x	123.05 (100.35)	286.44 (233.60)
RD(31)	敌百虫	22.9084 (6.772)	−3.448 + 6.212x −0.3359 + 6.4236x	142.11 (42.01)	303.62 (89.75)
MD(31)	马拉硫磷	3.5766 (4.678)	2.438 + 4.629x 0.2242 + 7.1075x	21.09 (27.58)	49.09 (64.21)
	敌百虫	9.8973 (3.007)	0.213 + 4.809x −0.0369 + 10.5351x	61.40 (18.65)	131.18 (39.85)
M-D(32)	马拉硫磷	4.6497 (3.352)	−2.065 + 10.586x −0.6328 + 10.7234x	27.42 (19.76)	63.82 (46.01)
	敌百虫	4.0256 (3.442)	−1.615 + 10.937x −0.3990 + 10.0569x	24.97 (21.35)	53.35 (45.62)

注 括弧内的数字为 F_{25} 的数据。

对它们产生抗性的速度要比混用和交替使用的 MD 和 M-D 品系快得多。MD 和 M-D 品系对马拉硫磷的抗性水平相差不多，而 MD 品系对敌百虫的抗性水平比 M-D 品系要高得多。

二、酯酶的活性测定

RM、RD、MD、M-D 和 S 品系的羧酸酯酶，酸性磷酸酯酶和乙酰胆碱酯酶活力测定，其中 RM 品系的羧酸酯酶的活性最高，为 S 品系的 14.4 倍，而 RD、MD 和 M-D 品系的羧酸酯酶活性相差不多，约为 S 品系的 4—6 倍。RM 和 S 品系的酸性磷酸酯酶的活性无差异，而 RD、MD 和 M-D 品系的酸性磷酸酯酶的活性较 S 品系略低。RM、RD、M-D 和 MD 品系的乙酰胆碱酯酶的活性都稍低于 S 品系。

三、酯酶同功酶的酶谱分析

1. 酯酶鉴别 从图 4 S 品系酯酶电泳扫描可见 13 条酯酶带。其中 E_{1-5} 为 $10^{-4}M$ 毒扁豆碱和 $10^{-5}M$ 对氧磷所抑制(图 1, 3)是胆碱酯酶；E_{8-11} 为 $10^{-4}M$ TPP 和 $10^{-5}M$ 对氧磷所抑制，但没有被毒扁豆碱所抑制(图 2, 3)是羧酸酯酶；E_{6-7} 既不被对氧磷也不为毒扁豆碱所抑制(图 1, 3)为芳族酯酶；E_{12-13} 由于本身染色很浅，难以鉴别。

2. 羧酸酯酶的酶谱比较 由图 4—8 可见在 S 品系的 E_{8-11} 处，RM、RD、MD 和 M-D 四个品系的雌性成蚊均有一条染色比 S 品系深而宽的羧酸酯酶带，其染色程度 RM 品系最强，其它三个品系相差不多，表明 RM 品系的羧酸酯酶活性比其它三个抗性品系

更强。

3. 酸性磷酸酯酶的酶谱比较 从图 9—13 可见五个品系的雌性成蚊均有酸性磷酸酯酶存在(未发现碱性磷酸酯酶),并为 TBPT(O) 所抑制(图 14)。S 和 RM 品系的电泳扫描极为相似(图 9, 10)均有 6 条酯酶带,其活力也很接近; MD 和 M-D 品系也有相应的 6 条酯酶带,但 E_{4-5} 带活力较低(图 12, 13); 而 RD 品系则只分离出 4 条酯酶带,即 $E_{1,2,3,6}$。没有发现 $E_{4,5}$ 带(图 11)。

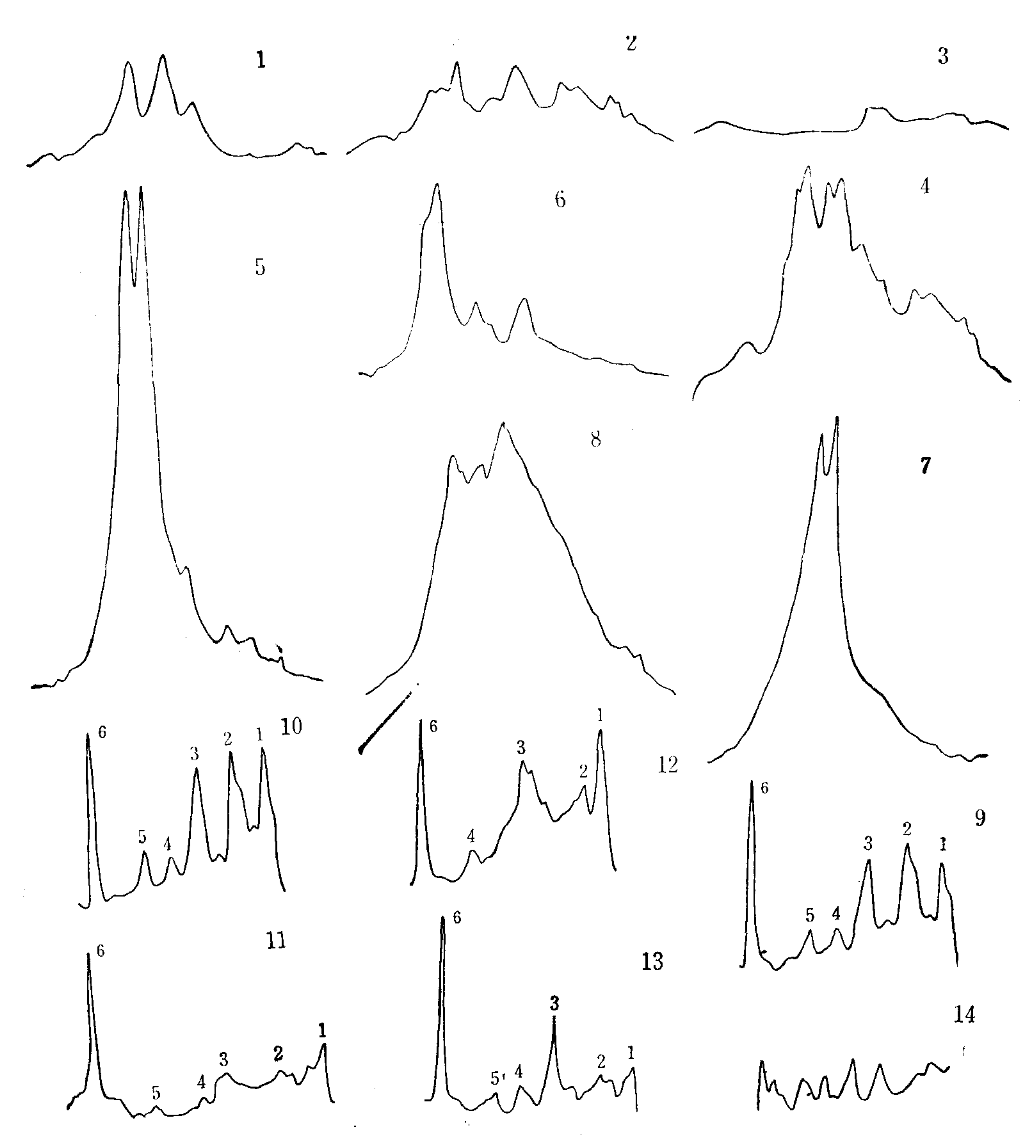


图 1—14 抗敌百虫和马拉硫磷淡色库蚊酯酶同功酶扫描图

1. 毒扁豆碱 ($10^{-4}M$) 抑制 2. TPP ($10^{-4}M$) 抑制 3. 对氧磷 ($10^{-5}M$) 抑制 4. 正常的酯酶 (S 品系) **5.** RM 品系的酯酶 6. RD 品系的酯酶 7. MD 品系的酯酶 8. M-D 品系的酯酶 9. S 品系的酸性磷酸酯酶 10. RM 品系的酸性磷酸酯酶 11. RD 品系的酸性磷酸酯酶 12. MD 品系的酸性磷酸酯酶 13. M-D 品系的酸性磷酸酯酶 14. TBPT(O) ($10^{-5}M$) 抑制

讨　　论

Iwata（1981）认为具有负交互抗性或具有增效的几种作用机理不同的杀虫剂进行轮用和混用才会延缓昆虫对杀虫剂的抗性。本文结果表明作用机理相同的二种有机磷杀虫剂的轮用和混用也具有延缓抗性的作用，其原因可能是这两种杀虫剂虽然作用机理相同，但抗性遗传机制却不相同。已研究结果表明敌百虫是多因子遗传（张朝远等，1982—3），马拉硫磷为单因子遗传（黎云根等，1982—3）。

将 RM 和 RD 品系在 F_{30} 或 F_{31} 代的抗性水平与 F_{25} 代的结果（表 2 括弧内的数据）作一比较，RD 品系在 F_{25} 代时对敌百虫的抗性为 S 品系的 89.75 倍，而到 F_{31} 代则高达 303 倍，在 6 代中净增 213 倍。与此同时 RM 品系对马拉硫磷抗性仅增加 53 倍。这可能是因为淡色库蚊对敌百虫抗性是多因子遗传（张朝远、陈文美等，1982—3），在前阶段抗性发展较慢，而后来在进一步筛选的情况下，不同的抗性基因互相作用的结果（Plapp, 1970）。另外 MD 和 M-D 品系在 F_{25} 代时对敌百虫和马拉硫磷的抗性均较低，但在 F_{31} 或 F_{32} 代时，MD 品系对敌百虫抗性高达 131 倍，较 F_{25} 代高 91 倍，由此可见在研究杀虫剂混用与抗性发展的关系时，应尽可能作较长期的试验才能得出比较确切的结论。从 F_{25} 代的结果来看，马拉硫磷和敌百虫混用和交替使用均能延缓其抗性发展，但从 F_{30} 或 F_{31} 代的结果来看，则交替使用比混用更好。根据上述结果来分析，若将混用与作用机理不同的其它杀虫剂交替使用可能会延缓混用后的抗性发展。

陈巧云、姜家良等（1980）发现抗敌百虫淡色库蚊有 11 条酯酶带，本结果与此接近，所不同的是陈巧云等发现芳族酯酶带为 E_7，本结果则为 E_{6-7}，S 品系有 13 条而不是 11 条酯酶带，这可能是电泳条件不同所致，本实验用的是稳流电泳仪，而陈巧云等用的是稳压电泳仪，从结果来看，前者的分离效果似乎比后者要好。

本实验中羧酸酯酶电泳图谱和离体酶活性测定结果基本一致，五个品系主要差别是羧酸酯酶的活力不同，S 品系活力最低，RM 品系最高，其它三个品系居中，这和五个品系对马拉硫磷和敌百虫的抗性程度也是一致的。所以可以说羧酸酯酶活性提高是引起马拉硫磷和敌百虫抗性增加的主要原因。但敌百虫分子结构中并没有羧酸酯键，这如何来解释羧酸酯酶与敌百虫抗性的关系呢？姜家良、陈巧云等（1980）的 Ki 值测定发现抗敌百虫淡色库蚊的羧酸酯酶对敌百虫及敌敌畏的亲和力比胆碱酯酶分别大 30 和 10 倍。这表明敌百虫进入体内后，可能首先与羧酸酯酶结合，从而免除或减缓了对靶子酶 AchE 的作用，起了保护作用。但抗马拉硫磷和抗敌百虫品系内的羧酸酯酶是否在质上有差异，这有待作进一步研究。

RM 和 S 品系的酸性磷酸酯酶的电泳图谱和离体酶活力极为相似，这表明 RM 品系对马拉硫磷抗性与酸性磷酸酯酶无关，仅与羧酸酯酶有关。RD 和 S 品系的酸性磷酸酯酶图谱有一定差异，S 品系有 6 条酯酶带，RD 只有 4 条，这和陈巧云、姜家良等（1980）的结果有所不同，这是否就意味着敌百虫抗性还和酸性磷酸酯酶有关，还需作进一步研究。

参　考　文　献

陈巧云，姜家良，林国芳，刘维德　1980　淡色库蚊对敌百虫抗性的研究——水解酶同敌百虫抗性的关系。**昆虫学报** **23**(4)：350—7。

张朝远、陈文美、刘维德 1982—3 淡色库蚊抗敌百虫品系的遗传研究。昆虫学研究集刊 第三集 93—98 页。上海科技出版社。

唐振华 1980 杀虫剂混用的毒力测定。昆虫知识 **17**(3): 136—8。

唐振华 1982 我国农业害虫抗药性及其对策。植物保护 **9**(1): 22—4。

唐振华、黎云根、刘维德 1982—3 敌百虫和马拉硫磷混用及交替使用对淡色库蚊抗性发展影响的研究。昆虫学研究集刊 第三集 55—64 页。上海科学技术出版社。

黎云根、唐振华 1984 抗马拉硫磷淡色库蚊的生化遗传研究。昆虫学研究集刊 第四集 120—124 页。上海科学技术出版社。

黎云根、唐振华、刘维德 1982—3 抗马拉硫磷淡色库蚊的形式遗传研究。昆虫学研究集刊 第三集 85—92 页。上海科学技术出版社。

姜家良、陈巧云、黄刚、张勤争 1980 抗有机磷淡色库蚊的羧酸酯酶研究。昆虫学研究集刊 第一集 69—76 页。上海科学技术出版社。

Bessey, O. A. Lowry, O. H. and Brock, M. J. 1946 A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. biol. chem.* **164**: 321—9.

Ellman, G. L. Courthey, K. D. Andres, V. Jr. and Featherstone, R. M. 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activ ity. *Biochem Pharmacol.* **7**: 88—95.

Georghiou G. P. 1980 Insecticide resistance and prospects for its management. *Residue Review.* **76**: 131—45.

Iwata, T. 1981 Effect of pesticide combinations on the development of a resistance in green rice leafhopper. *Nephotettix cinctieeps* Uhler. *Japan. Pesticide Information* **39**: 3—7.

Lowry, O. H. Rosebrongh, N. J. Farr, A. L. and Rand all, R. L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265—75.

Plapp, F. W. Tr. 1970 On the molecular biology of insecticide resistance Biochemical Toxicology of Insecticides PP, 179—92. Aeademic Press. 1970 New York, London.

Sawicki, R. M. 1975 Effects of sequential resistance on pesticide management. Proc. 8th British Ins. and Fung. Conf. PP, 799—811.

Van Asperen, K. 1962 A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *J. Ins. Physiol,* **8**: 401—16.

STUDIES ON THE ROTATIONAL AND MIXED USE OF MALATHION AND DIPTEREX IN *CULEX PIPIENS PALLENS*: ESTERASE ISOZYMES IN RELATION TO RESISTANCE

TANG ZHEN-HUA LI YUN-GEN
(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica)

In *Culex pipiens pallens*, the F_{30} selected by Malathion (strain RM) and the F_{31} selected by Dipterex (strain RD) developed 286 fold and 303 fold resistance toward Malathion and Dipterex respectively. The F_{31} selected by the mixture (strain MD) and the F_{32} selected by rotational treatment of these two insecticides (strain M-D) developed resistance on moderate levels towards either Malathion or Dipterex. The carboxylesterase activities were found to be considerably stronger in the adult mosquitoes of the resistant strains (RM, RD, MD, and M-D) than in those of the susceptible strain (strain S), as manifested in the enzymologic determination *in vitro* as well as in the esterase zymograms of electrophoresis. The phosphatase zymograms showed six bands in the S, RM, MD and M-D strains but four bands in the RD strain. There was no conspicuous difference in the cholinesterase activities and in the cholinesterase zymograms in the different strains of this mosquito.

Key words *Culex pipiens pallens*—Malathion—Dipterex—insecticide resistance—esterass—isozyme